

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000104

International filing date: 12 January 2005 (12.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0012026
Filing date: 23 February 2004 (23.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

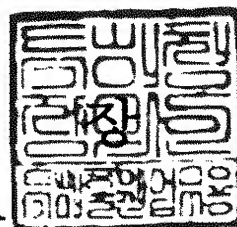
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0012026 호
Application Number 10-2004-0012026

출 원 년 월 일 : 2004년 02월 23일
Date of Application FEB 23, 2004

출 원 인 : 재단법인서울대학교산학협력재단
Applicant(s) Seoul National University Industry Foundation

2005 년 1 월 24 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.23
【발명의 명칭】	신규 녹색지속 유전자
【발명의 영문명칭】	A Novel STAY-GREEN Gene
【출원인】	
【명칭】	재단법인 서울대학교산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	백남천
【성명의 영문표기】	PAEK,NAM CHON
【주민등록번호】	620227-1066715
【우편번호】	441-704
【주소】	경기도 수원시 권선구 금곡동 530 LG빌리시아파트 307-1702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고희종
【성명의 영문표기】	KOH,HEE JONG
【주민등록번호】	580910-1932519
【우편번호】	440-152
【주소】	경기도 수원시 장안구 화서2동 730 꽃뫼마을 코오롱아파트 174-1302
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	7
【서열목록의 전자파일】	첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이처영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 54 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권 주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 20 항 749,000 원

【합계】 787,000 원

【감면사유】 전담조직

【감면 후 수수료】 393,500 원

【첨부서류】 1. 전담조직임을 증명하는 서류_1통 2.기타첨부서류[개별 위임장]_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 식물의 노화시 엽록소 (chlorophyll) 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 새로운 *SGR* 유전자 (*STAY-GREEN*) 및 상기 유전자를 변이시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 황화가 일어나는 식물에서 상기 *SGR* 유전자를 변이시키거나, *SGR* 유전자의 발현을 억제시키거나, 또는 상기 *SGR* 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 무력화시킴으로써 식물의 황화를 방지하여 녹색을 오래 유지시킬 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

엽록소, *SGR* 유전자, 녹색지속, 식물, 노화, 변이, 벼

【명세서】

【발명의 명칭】

신규 녹색지속 유전자 {A Novel STAY-GREEN Gene}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 식물 노화시 정상형 (wild-type) 개체와 비교하여 상대적으로 녹색지속성을 나타내는 변이체에서, 유형별 잎의 광합성율과 엽록소 함량의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 2는 벼의 녹색지속 변이체 (오른쪽)와 정상형 개체 (왼쪽)간의 표현형 차이를 나타내는 사진이다. A는 벼 이삭의 출수 시점이고, B는 종자가 여무는 동안 자연적 노화가 진행된 후이며, C는 한 달간 자란 벼를 잘라 암처리하여 인위적으로 노화를 유도시킨 후를 나타낸 것이다.

도 3은 벼의 녹색지속 변이체와 정상형 개체간에 잎의 노화에 따른 엽록소 농도 변화를 비교한 그래프이다.

도 4는 벼의 녹색지속 변이체와 정상형 개체간에 잎의 노화에 따른 광합성 효율의 변화를 나타낸 것이다.

도 5는 녹색지속 *sgr* 변이 유전자가 벼의 9번 염색체 장완에 위치함을 나타내는 유전자지도이다.

도 6은 벼의 녹색지속 변이체와 정상형 개체의 잎을 6일간 암처리하여 노화를 유도시킨 후, 잎의 엽록소와 그 분해 산물들의 standard를 이용하여 HPLC를 통해 비

교 분석한 결과를 나타낸 것이다. Chl a 및 Chl b는 각각 chlorophyll a 및 chlorophyll b를 나타내고, Chlide a는 chlorophyllide a를 나타내며, Pheo a는 pheophorbide a를 나타낸다.

도 7은 벼의 녹색지속 변이체와 정상형 개체의 잎을 암처리하여 노화를 유도시킨 후, 엽록체(chloroplast)의 틸라코이드막(thylakoid membrane)에 부착되며 엽록소를 함유하는 LHCP I (light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein I) 및 LHCP II의 subunit 단백질들과, 엽록소를 함유하지 않는 D1, psa A/B 및 사이토크롬 단백질 Cyt *b₆f*의 암처리 시간에 따른 변화를 나타낸 웨스턴블로팅 결과이다.

도 8은 벼의 녹색지속 변이체와 정상형 개체의 잎을 암처리하여 노화를 유도시킨 후, 엽록체의 분해과정을 투사전자현미경(TEM)으로 관찰한 사진이다. A와 B는 녹색지속 변이체와 정상형의 암처리 직전 정상적인 엽록체를 나타낸 것이고, C는 암처리 9일 후, 녹색지속 변이체의 세포를 나타낸 것이며, D는 암처리 9일 후의 정상형 개체의 세포를 나타낸 것이다. E는 녹색지속 변이체의 세포에서 분해가 안된 엽록체의 틸라코이드막으로, 사진 C의 네모박스 부위를 확대한 것이다.

도 9는 녹색지속 *sgr* 변이유전자의 위치를 세부적으로 나타낸 유전자 지도이다.

도 10은 정상형 개체들(자포니카형 화청찰벼 및 인디카형 밀양23호 벼)과 화청찰벼에서 유래된 녹색지속 변이체 간의 게놈 DNA 염기서열을 비교하여 MNU에 의해 단일 염기 치환이 일어나 정상형 *SGR* 유전자에서 녹색지속 유전자로 변이가 일어난 부위를 나타낸 것이다.

도 11은 정상형 *SGR* 유전자의 염기서열 및 이로부터 추정된 아미노산 서열의 signal peptide 부위와 보존된 서열들과, 유전자내 녹색지속성을 유발하는 *SGR* 변이 유전자의 아미노산 변이 부위를 나타낸 것이다.

도 12는 정상형 벼에서 암처리로 노화를 유도시킨 경우, 즉 잎의 노화 유발시 암처리 시간의 증가에 따라 정상형 *SGR* 유전자가 대량 발현되는 것을 나타낸 노던블로팅 결과이다.

도 13은 정상형 벼를 2일 동안 암처리 한 후, 싸이토카이닌의 전구물질인 6-benzylaminopurine (6-BA)로 처리하여 노화를 억제시킨 경우, 정상형 *SGR* 유전자의 발현이 유도되지 않는 것을 보여주는 노던블로팅 사진이다.

도 14는 유전자지도 작성에 사용된 자포니카형 녹색지속 변이체 (1 레인), 인디카형 밀양23호 (2 레인) 및 이들을 교배해서 얻은 F₁ hybrid 식물체 (3 레인)의 게놈 DNA를 *Dra*I으로 처리한 후, 정상형 *SGR* 유전자를 프로브로 하여 써던블로팅한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 서열번호 2의 폴리펩타이드와 상동성을 가지는 폴리펩타이드를 비교한 것이다. (*)은 identical amino acid를 나타내고, (+)는 similar amino acid를 나타내며, (___)는 identical 영역(region)을, (---)는 similar 영역을 나타낸다.

도 16은 애기장대 성장 잎 (mature leaf)을 잘라 0(대조구), 1, 3, 6 및 9일간 암처리하여 얻은 RNA를 애기장대의 At4g22920과 At4g11910 유전자의 염기서열로부터 제작된 primer를 이용하여 RT-PCR을 한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<17> 본 발명은 식물의 노화시 엽록소 (chlorophyll) 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 새로운 *SGR* 유전자 (*STAY-GREEN*) 및 상기 유전자를 변이시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

<18> 노화는 식물의 성장과 발달과정에서 마지막 단계로, 식물노화는 엽록소의 분해에 의해 잎이 노랗게 되는 것 (황화)으로 알 수 있다. 잎의 노화는 몇몇의 환경적 요인과 발생학적 요인에 의해 유도되나, 수동적 퇴행보다는 식물이 가진 고유의 유전정보에 의한 노화대사과정에 따라 조절된다. 현재까지 여러 식물에서 일반적인 노화현상과 다른 현상을 보이는 변이체들이 발견되었는데, 특히 정상형 개체와는 달리 곡식이 여무는 단계를 지나서도 잎이 황색으로 변하지 않고 녹색을 유지하는 변이체를 ‘녹색지속 (stay-green)’ 또는 ‘비황화 (non-yellowing)’ 변이체라고 한다.

<19> 이 녹색지속성 형질을 나타내는 개체들은 그 성질에 따라 도 1과 같이 5가지 형태로 구분된다 (Thomas, H. & Howarth C.J., *J. Exp. Bot.*, 51:329-37, 2000). A형 녹색지속성은 노화의 시작이 많이 늦추어진 개체로, 한번 노화가 시작되면 정상형 개체와 같은 속도로 노화가 진행된다. B형 녹색지속성은 정상형 개체와 같은 시기에 노화가 시작되나 잎의 황화 진행이 느리고, 노화에 따른 광합성 효율의 저하속도 또한 느리게 진행된다. 상기 두 가지 형태는 곡식이 여무는 동안에도 광합성 효율이 상

대적으로 높게 유지되는 것에 기인한 '기능적 녹색지속성 (functional stay-green)' 변이체이다.

<20> 한편, C형 녹색지속성은 엽록소를 분해시키는 기작의 유전적 손상에 의해 엽록소가 분해가 되지 않고 계속 남아있기 때문에 잎의 녹색이 유지되는 돌연변이로, 이 형태의 돌연변이 개체는 생리적 기능들에 있어서는 정상적으로 노화가 진행되기 때문에 '비기능적 녹색지속성 (nonfunctional stay-green)' 또는 '표면적 녹색지속성 (cosmetic stay-green)'라고 불린다. D형 녹색지속성은 갑작스런 냉동이나 건조에 의하여 잎이 급격히 죽어버렸을 때 나타난다. 마지막으로, E형 녹색지속성은 잎에 엽록소가 상대적으로 높은 함량으로 축적되어 짙은 녹색을 유지하지만, 광합성 효율은 증가하지 않는 개체이다.

<21> 그러므로, 기능적 녹색지속성 (A형과 B형)은 곡식이 여무는 동안에도 엽록소양과 광합성 효율이 모두 높게 유지되는 반면, 비기능적 녹색지속성 (C형, D형 및 E형)을 갖는 잎은 녹색이 오래 유지되지만 광합성 능력은 정상형 개체와 거의 같다.

<22> 사료작물의 일종인 *Festuca pratensis*의 녹색지속 변이체의 생리적, 세포학적, 생화학적 및 유전적 특성이 이미 자세하게 보고된 바 있다 (Thomas, H., *Planta*, 137:53-60, 1977; Thomas, H., *Planta*, 154:212-8, 1982; Thomas, H., *Theor. Appl. Genet.*, 73:551-5, 1987; Thomas, H. & Matile, P., *Pytochemistry* 27:342-8, 1988). *Festuca pratensis*의 녹색지속성은 비기능적이며 자연적으로 돌연변이가 유도되었으며, 핵 유전자 '*sid*' 라는 단일 열성유전자에 의해 조절된다.

<23> 대두 (soybean)에서 발견된 녹색지속 변이체는 핵 유전자인

G 및 *d1d2*와 세포질 유전자인 *cytG*에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다 (Guamet, J.J. *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 31:1123-30, 1990). 우성유전자인 *G*는 콩의 껍질 표면을 녹색으로 유지시키고, 세포질 유전자인 *cytG*와 두개의 열성대립유전자인 *G_d1d1d2d2*와 함께 잎과 콩의 꼬투리, 콩 껍질 및 배의 녹색을 조절한다. *cytG*의 변이 기능은 노화가 진행되는 대두 잎에서 chlorophyll *b*를 chlorophyll *a*보다 안정화시켜 엽록소 분해를 저해하고, *d1d1d2d2* 동질접합체의 변이는 노화시 진행되는 수용성 단백질의 분해를 상당기간 지연시키는 것으로 알려져 있다 (Guamet, J.J. *et al.*, *Plant Physiol.*, 96:227-31, 1991; Guamet, J.J. *et al.*, *Plant Physiol.*, 96:655-61, 1996).

<24> 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris*) 품종 Red Mexican에서는 잎의 노화시 잎의 엽록소의 양이 감소하여 황화(yellowing)가 일어나는 반면, 녹색지속성 품종인 Alamo에서는 잎의 노화시 엽록소가 계속 남아 있다는 보고가 있다 (Bachmann, A. *et al.*, *New Phytol.* 126:593-600, 1994). 비황화 변이체 강낭콩 잎의 chlorophyllase 활성은 정상이었으며, 엽록소 분해산물 중 녹색을 갖는 pheophorbide *a*는 정상형 개체의 노화잎과 비황화 변이체의 노화잎 어디에서도 검출되지 않았다. 그러나, chlorophyllide *a* 및 *b*가 정상형 개체보다 비황화 변이체에서 더 높게 검출되었다. 이것은 변이체 잎의 노화과정에서 chlorophyllide의 분해가 원활히 이루어지지 않는다는 것을 나타내며, 아마도 비황화 변이체는 Mg-dechelataase 활성에 결함이 있는 것으로 추정된다 (Fang, Z. *et al.*, *J. Exp. Bot.*, 49:503-510, 1988).

<25> 대두 및 *Festuca pratensis* 녹색지속성 변이체에서 녹색지속성이 나타나는 것은 엽록소 분해작용 동안 pheophorbide

a oxygenase (PaO)의 활성이 낮은 것에 기인한다고 보고되었으나, 최근 애기장대에서 PaO 효소기능이 없는 *acd1* (*Arabidopsis-accelerated cell death 1*) 돌연변이체는 녹색지속성을 보이지 않는다고 보고되었다. 지금까지 자연적 또는 인위적으로 유도된 녹색지속 변이체 식물의 생리적 또는 표현형적 특성에 관한 여러 보고들이 있어왔으며, 본 발명자들은 선행연구에서 벼의 녹색지속 *sgr* 변이유전자가 9번 염색체 장완에 위치한다는 것을 밝힌 바 있다 (Cha, K.W. *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 104:526-32, 2002). 그러나 이 *sgr* 변이유전자의 정상형 (wild-type) 유전자의 염기서열 및 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산서열과 그 기능에 대한 것은 아직까지 밝혀지지 않았다.

<26> 이에, 본 발명자들은 녹색지속성 표현형질이 9번 염색체상의 어떤 유전자의 변이에 의한 것인지를 밝히고, 이 유전자의 위치 및 염기서열을 결정하고자 예의 노력한 결과, 벼의 9번 염색체 상에서 잎의 노화시 엽록소 분해와 관련된 새로운 *SGR* 유전자와 상기 유전자의 열성 돌연변이 (recessive mutation)가 일어난 녹색지속 *sgr* 변이 유전자의 돌연변이 부위를 지도기초동정법 (map-based cloning)으로 발견하고, 식물이 녹색지속성이 발견된 *SGR* 유전자의 돌연변이에 의해 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<27> 본 발명의 목적은 노화시 엽록소 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 새로운 *SGR* 유전자의 염기서열 및 상기 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 제공하는데 있다.

<28> 본 발명의 다른 목적은 상기 *SGR* 유전자를 변이시키는 것을 특징으로 하는 녹색 지속성 변이 식물체의 제조방법을 제공하는데 있다.

<29> 본 발명의 또 다른 목적은 *SGR* 유전자의 발현을 억제시키거나, 상기 *SGR* 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 무력화 시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<30> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역 (conserved amino acid sequence region)과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하고, 식물 노화시 엽록소 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 *SGR* 유전자를 제공한다.

<31> 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

<32> 본 발명은 또한, 상기 *SGR* 유전자를 변이시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 할 수 있고, 구체적으로는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 할 수 있으며, 보다 구

체적으로는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 변이는 상기 유전자의 일부를 결실시키거나, 상기 유전자의 일부를 단일 또는 복수의 다른 염기로 치환시키거나, 또는 상기 유전자에 단일 또는 복수의 다른 염기를 첨가시키는 것을 특징으로 할 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 *SGR* 유전자에서 295번째 염기인 G를 A로 치환시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

- <33> 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 제공한다.
- <34> 본 발명은 또한, 상기 *SGR* 유전자 함유하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다.
- <35> 본 발명은 또한, 상기 *SGR* 유전자로 형질전환된 식물을 제공한다.
- <36> 본 발명은 또한, 황화가 일어나는 식물에서 *SGR* 유전자의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 할 수 있고, 구체적으로는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <37> 본 발명은 또한, 황화가 일어나는 식물에서

SGR 유전자가 코딩하는 단백질을 무력화 시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 할 수 있고, 구체적으로는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

<38> 본 발명에 있어서, 녹색지속 *sgr* 변이유전자는 정상형 *SGR* 유전자의 기능이 상실되어 노화시 식물을 황화시키지 않고 녹색으로 유지시키는 기능을 가지는 것을 총칭한다. 이러한 *sgr* 변이유전자는 상기 *SGR* 유전자의 일부를 결실시키거나, 상기 유전자의 일부를 단일 또는 복수의 다른 염기로 치환시키거나, 또는 상기 유전자에 단일 또는 복수의 다른 염기를 첨가시켜 수득할 수 있다.

<39> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<40> 특히, 하기 실시예에서는 식물의 노화시 엽록소 분해대사에 필수적인 *SGR* 유전자 및 MNU 돌연변이원에 의해 기능이 상실된 녹색지속 변이체 및 *sgr* 변이유전자에 대해서만 기술하고 있으나, 상기

SGR 유전자를 함유하는 재조합벡터, 상기 재조합벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 유전자 정보를 이용하여 형질전환된 식물을 제조하는 것은 당업자에게 자명한 사항이라 할 것이다. 또한, 황화가 일어나는 식물에서 *SGR* 유전자의 발현을 억제시키거나 유전자가 코딩하는 단백질을 불활성화 시켜 녹색지속성 변이 식물체를 제조하는 것 역시, 당업자에게 자명한 사항이라 할 것이다.

<41> **실시예 1: MNU (N-methyl-N-nitrosourea) 처리를 통한 녹색지속 변이체 벼의 유도**

<42> 본 실시예에서는 자포니카 벼품종인 화청찰벼의 수정란에 MNU mutagen을 처리하여 녹색지속 변이체 (stay-green mutant)를 유도하였다.

<43> 자포니카 화청찰벼에 MNU를 처리한 M1 종자 약 1,500 개체를 뿌려 M1 식물체로부터 약 30,000개체의 M2 종자를 수확한 후, 이를 파종하여 자란 M2 식물체들 중에서 이삭이 여문 후에도 녹색잎 형질을 나타내는 녹색지속 변이체를 얻었다. 상기 벼는 출수기까지 영양생장하는 동안은 정상형 벼와 다른 표현형질을 나타내지 않았다 (도 2A) .

<44> 이삭이 여물동안 정상형 벼의 잎색은 노화가 유도되어 점진적으로 노랗게 변한 반면, 녹색지속 변이체의 잎색은 여전히 녹색으로 남아 있었다 (도 2B) . 채취한 잎을 2주간 암처리 (dark treatment)하여 노화를 유도한 경우에도 상기 변이체의 잎은 녹색을 유지하였으며, 정상형 잎은 완전히 노랗게 변색되었다. 또한, 벼가 어떤 성장주기에 있든지, 9일간 암상태에서 노화를 유도 (dark-induced senescence)하면, 자연적 노화 (natural senescence)시 보이는 표현형 (도 2B)과 동일한 결과를 나타냈다 (도 2C) .

<45> **실시예 2: 녹색지속 변이체 벼의 표현형질과 생리적 성질**

<46> 녹색지속 변이체 벼는 출수기, 간장, 이삭길이, 주당 이삭수, 이삭당 영화수, 임성, 천립중, 종자의 크기, 주당 수확량 등의 표현형질에 대하여 정상형 개체와 차이를 보이지 않았다 (표 1). 즉, 표 1에서 나타난 바와 같이, 녹색지속성을 제외하고는 여러 가지 농업적 특성에 있어서 변이체와 정상체 간의 차이가 없었다.

<47> **【표 1】**

녹색지속 변이체 벼와 정상형 벼 간의 농업적 특성 비교

Line	Heading Date	Culm	Panicle	Panicles/	Spikelets/	Fertility (%)	1000 Grain Weight (g)	Grain Size			Yield/
		Length (cm)	Length (cm)	Hill (No.)	Panicle (No.)			Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	Hill (g)
Fwachaongkyeo	8.17	88.0	18.7	17.3	129.0	92.8	21.7	4.7	2.7	1.9	45.0
Fwachaong-#x	8.18	93.7	21.4	17.0	126.7	91.2	20.3	4.7	2.7	1.9	42.6
Stay-green	8.18	93.3	20.8	17.5	129.5	92.7	20.5	4.7	2.7	1.9	43.0
Difference	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

<48> 녹색지속 변이체와 정상형 개체에서 출수후 이삭이 여무는 동안 잎의 노화에 따른 엽록소 농도변화를 조사하였다 (도 3). 잎의 엽록소는 80% 아세톤으로 추출하였고, 분광광도계를 이용하여 그 농도를 측정하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 변이체와 정상형의 엽록소 농도는 벼의 출수시점 때까지 별 차이가 없었으나, 이삭이 여무는 동안 정상형과 변이체 간의 표현형질 차이가 분명해지면서, 정상형은 노랗게 변색되는 반면, 변이체는 개화 후 50일이 지나, 서리가 내리는 초겨울 온도가 되어도 녹색을 유지하였다.

<49> 정상형 잎과 변이체 잎의 광합성 효율을 LI-6400 (Li-Cor, USA) 기기로, LED 광원을 1,000 $\mu\text{mole m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 고정하여 25℃에서 측정하였다. 동일한 실험을 세 번 이상 반복하여 평균과 표준편차를 구하고, Fisher의 LSD를 사용하여 비교하였다 (도 4). 도 4에 나타난 바와 같이, 엽록소 농도의 감소율은 변이체가 정상형보다 훨씬 느렸으나, 광합성 효율은 이삭이 여무는 동안 잎이 황색으로 변색되는 정상형과 녹색을 유지하는 녹색지속 변이체 간에 별 차이가 없었다.

<50> **실시예 3: 표현형 마커와 분자 마커를 이용한 유전자지도 작성**

<51> 본 발명자들은 선행연구에서 녹색지속 *sgr* 변이유전자가 단일 열성인자 (a single recessive gene)로 유전되며 벼의 9번 염색체 장완에 위치한다는 것을 밝힌 바 있다 (Cha, K.W. *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 104:526-32, 2002).

<52> 식물 노화시 엽록소 분해가 억제되는 녹색지속 *sgr* 변이유전자의 염색체상의 위치를 알아내기 위한 유전자지도 작성용 F₂ 집단을 만들기 위하여, 자포니카인 상기 녹색지속 변이체를 통일벼 품종인 정상형 밀양23호 (인디카와 자포니카의 잡종으로 거의 인디카의 유전적 조성을 가짐)와 교잡하여 두 부분, F₁ hybrid 및 305개체의 F₂의 잎에서부터 게놈 DNA를 분리하였다.

<53> 표현형 마커를 사용한 유전자 연관분석에 의해 *sgr* 변이유전자가 9번 염색체 상에 존재하는 *Dn-1* (*Dense panicle-1*) 유전자와 25%의 재조합율로 연관되어 있음을 밝혀 내었다. 9번 염색체상에 존재하는 분자 마커를 웹 데이터베이스 (RiceGenes, USA: <http://genome.cornell.edu/rice> 및 Rice Genome Research Program, Japan:

<http://rgp.dna.affrc.go.jp>)에서 검색하여 *sgr* 변이유전자 위치에 근접할 후보 마커들을 선택하여 mapping 하였다.

<54> 녹색지속 변이체와 정상형인 밀양23호 사이에 RM160과 RM189의 두개의 SSR(simple sequence repeat) 마커가 각각 0.1kb와 0.13kb의 polymorphic band를 나타내었다. 한 개의 STS(sequence tagged site)인 T4의 경우, 녹색지속 변이체에서는 0.6kb의 단일밴드를 나타낸 반면, 밀양23호에서는 밴드가 나타나지 않아, polymorphism을 검출하는데 유용하였다.

<55> 9번 염색체 상에 있는 RFLP 마커중 녹색지속 변이체와 밀양23호의 게놈 DNA간에 제한효소에 의해 polymorphism을 보이는 RG662 (*Dra*I), RG570 (*Eco*RV), C1263 (*Dra*I) 및 C985 (*Eco*RI)를 프로브로 하여 305 개체의 F₂의 게놈 DNA를 분석하여 *SGR* 변이 유전자의 위치를 나타내는 유전자지도를 완성하였다 (도 5).

<56> MAPMAKER/EXP 3.0 (Lander, E.S. *et al.*, *Genomics*, 1:174-81, 1987)을 사용하여 계산한 결과, 9번 염색체 장완의 RG662 마커와 C985 마커 사이에서 *sgr* 변이유전자의 위치가 각각 1.8cM과 2.1cM이었다 (Cha, K.W. *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 104:526-32, 2002).

<57> **실시에 4: 녹색지속 변이체 노화잎의 HPLC 분석**

<58> 엽록소 분해대사에 직접적으로 관여하는 핵심적인 효소인 chlorophyllase, Mg-dechelataase 및 pheophobide

a oxygenase (PaO)는 노화가 진행되는 잎에서 특히 높은 활성으로 발현된다. 강낭콩 () 비황화 변이체는 노화잎에서 정상형에 비해 chlorophyllide가 높게 축적되므로, 이는 Mg-dechelataase의 기능이 상실 또는 약화된 변이체로 추정되며, 사료작물 *Festuca pratensis*의 비황화 변이체는 PaO 효소활성이 정상형보다 낮으므로 PaO 기능상실 및 기능약화 변이체로 추정된다고 보고된 바 있다.

<59> 따라서, 본 실시예에서는 녹색지속 변이체 벼에서 노화잎의 엽록소 함량을 조사하였다. 도 6은 본 발명의 녹색지속 변이체 벼와 정상형 벼를 6일간 암처리하여 노화를 유도시킨 후, 잎의 엽록소와 그 중간 분해산물을 HPLC로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 도 6에서, Chl a 및 Chl b는 각각 chlorophyll a 및 chlorophyll b를 나타내고, Chlide a는 chlorophyllide a를 나타내며, Pheo a는 pheophorbide a를 나타낸다.

<60> 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 벼의 녹색지속 변이체 (stay-green mutant)는 엽록소 함량이 정상형 (화청찰벼; Hwacheong-wxx)보다 느리게 감소하는 것으로 나타났으며, 엽록소가 분해되어 생기는 중간물질의 축적은 나타나지 않았다.

<61> 실시예 5: 노화처리된 녹색지속 변이체 잎의 웨스턴블로팅

<62> 비황화 변이체들에서 노화가 진행되는 정상형의 잎에서 그 농도가 급격히 감소하는 LHCP II (light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein II)가 안정적으로 존재한다는 것이 이미 보고된 바 있다.

<63> 따라서 본 실시예에서는 벼의 녹색지속 변이체와 정상형 개체의 잎을 암처리하여 노화를 유도시킨 후, 엽록체 (chloroplast)의 틸라코이드막 (thylakoid membrane)에 부착되며 엽록소를 함유하는 LHCP I (light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein I) 및 LHCP II의 subunit 단백질들과, 엽록소를 함유하지 않는 D1, psa A/B 및 사이토크롬 단백질 Cyt *b₆f*의 암처리 시간에 따른 변화를 웨스턴블로팅을 통하여 조사하였다 (도 7).

<64> 도 7에 나타난 바와 같이, 녹색지속 변이체 벼의 경우, 암처리에 의해 노화가 진행되는 잎에서도 LHCP I의 subunits (Lhca1, Lhca2, Lhca3 및 Lhca4)과 LHCP II의 subunits (Lhcb1, Lhcb2, Lhcb5 및 Lhcb6)이 매우 안정하게 존재한다는 것을 알 수 있었다. 반면, 엽록소를 함유하지 않는 D1, Cyt *b₆F* 및 psa A/B와 같은 단백질은 정상형 (WT)과 마찬가지로 분해되고 있었다. 이 결과로부터 SGR 단백질은 노화과정에서 LHCP I과 LHCP II의 subunit 들을 분해하는데 필수적으로 관여하는 것으로 추정할 수 있다.

<65> **실시예 6: 노화처리된 녹색지속 변이체 잎의 투사전자현미경 분석**

<66> 투사전자현미경분석 (TEM)을 통하여 녹색지속 변이체의 노화진행 잎에서 엽록체의 변화를 분석하였다 (도 8). 도 8에서, A와 B는 녹색지속 변이체와 정상형의 암처리 직전 정상적인 엽록체를 나타낸 것이고, C는 암처리 9일 후, 녹색지속 변이체의 세포를 나타낸 것이며, D는 암처리 9일 후의 정상형 개체의 세포를 나타낸 것이다. E는 녹색지속 변이체의 세포에서 분해되지 않은 엽록체의 틸라코이드막으로, 사진 C의 네모박스 부위를 확대한 것이다.

<67> 도 8에 나타난 바와 같이, 변이체의 잎에서도 엽록체의 분해는 일어났지만, 정상형과는 다른 점이 발견되었다. 또한 9일간의 암처리를 통하여 노화를 유도시킨 후, 정상형의 잎과 녹색지속 변이체의 잎을 분석한 결과, 정상형 잎의 엽록체는 완전히 분해되어 사라졌지만, 변이체의 잎에서는 그라나 구조가 없는 틸라코이드막들이 여전히 남아있는 것이 관찰되었다. 노화가 진행되는 변이체의 잎에서 엽록체의 틸라코이드막이 분해되지 않고 지속적으로 남아 있는 것은 상기 막에 부착되어 있어 엽록소를 감싸고 있는 LHCP I 및 LHCP II subunit 단백질들이 분해되지 않는 것과 관련이 있는 것으로 추정할 수 있다.

<68> **실시에 7: *SGR* 유전자 및 녹색지속 *sgr* 변이유전자의 클로닝**

<69> 상기 실시에 3에서 작성한 유전자지도를 기본 자료로 이용하여 *sgr* 변이유전자를 클로닝하였다. 상기 유전자지도에 나타난 바와 같이, *sgr* 변이유전자는 벼의 9번 염색체 장완의 RFLP 마커인 RG662와 C985 사이의 3.9cM내에 존재한다.

<70> SSR 마커와 RFLP 마커를 사용한 fine-mapping 결과, *sgr* 변이유전자는 0.6cM 간격으로 SSR 마커인 RM3636과 RM1553 사이에 존재하였다. RM3636과 RM1553 마커 사이의 물리적 거리는 PAC (AP005314) 와 BAC (AP005092) 클론에서 DNA 염기서열이 해독된 정보를 이용하여 예측할 때, 약 150kb이다 (Rice Genome Research Program, Japan: <http://rgp.dna.affrc.go.jp>). 이 염기서열 구간은 약 13개의 유전자가 존재할 것을 예측되었으며, 그중 하나가 *sgr* 변이유전자로 추정되었다.

- <71> 상기 150kb의 염기서열 구간내에서 *sgr* 변이유전자의 위치를 정확히 알아내기 위하여, RGP에서 얻은 *japonica*종 150kb 염기서열을 NCBI BLAST에서 *indica*종 벼의 게놈 DNA 염기서열과 비교하여 SSR, CAPS 및 AFLP와 같은 PCR로 탐색 가능한 polymorphic DNA 마커를 찾아내어 PCR을 수행하였다.
- <72> 860개의 유전자지도 작성용 F₂ 개체 게놈 DNA에서 RM3636과 RM1553 마커를 이용하여 *sgr* 변이유전자를 포함하는 40개의 재조합 개체를 분리하고, 이 중 최종적으로 2개의 재조합 개체에서, 공지된 서열 AP005314에 존재하는 AFLP (101.6kb) 와 CAPS (105.9kb) 마커 사이에 *sgr* 변이유전자의 변이부위가 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 *sgr* 변이유전자의 DNA상 변이 부위가 4.3kb내에 위치하는 것을 나타내는 것이다 (도 9).
- <73> 다음으로, 화청찰벼에서 인위적 돌연변이에 의해 생긴 녹색지속 변이체와 정상형 화청찰벼 (*japonica*), 밀양23호 (*indica*), 그리고 몇 가지 녹색지속형질을 갖는 F₂ 개체의 게놈 DNA에서 돌연변이가 일어난 부위로 예측되는 4.3kb 부위를 각각 PCR을 통하여 증폭하고 각각의 염기서열을 확인하였다.
- <74> 그 결과, 녹색지속 변이체들의 DNA에서 S20246 EST (expressed sequence tag)의 exon2 내의 G가 A로 치환되는 단일 염기 돌연변이가 공통적으로 관찰되었고, 이는 S20246 EST의 아미노산 서열에서 발린 (gtg)이 메티오닌 (atg)으로 치환되는 결과를 가져오게 된다 (도 10). 이러한 변이에 대해, 정상적인 염기서열 (G) 및 아미노산 (발린)을 갖는 S20246 유전자는 식물 노화시 엽록소 분해대사에 필수적으로 관여하여 황화를 유발하는 *SGR* 유전자라 할 수 있다.

<75> **실시예 8: 엽록소 분해대사에 필수적인 *SGR* 유전자의 특성**

<76> 서열번호 1의 염기서열을 가지는 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 274개의 아미노산으로 구성된 30,880 분자량의 폴리펩타이드를 코딩한다. *SGR* 단백질은 아미노말단 (N-terminus)에 chloroplast-targeting signal peptide를 가지며, 한 개의 카제인 카이네이즈 II 인산화 부위 (CKII: putative casein kinase II phosphorylation site)인 THSD와 두 개의 프로테인 카이네이즈 C 인산화 부위 (PKC: putative Protein kinase C phosphorylation site)인 SRR와 TAR)를 가진다 (도 11).

<77> 한편, 정상형 벼에서 암처리로 잎의 노화를 유발시킨 경우, 도 12에 나타난 바와 같이, 암처리 시간의 증가에 따라 *SGR* 유전자는 잎에서 높은 수준으로 발현되었다. 또한, 정상형 벼를 2일 동안 암처리 한 후, 싸이토카이닌 전구물질인 6-benzylaminopurine (6-BA)로 처리하여 노화를 억제시킨 경우, 도 13에 나타난 바와 같이, *SGR* 유전자의 발현이 억제되었다.

<78> 이로부터, *SGR* 유전자는 아직까지 밝혀지지 않았던 엽록소분해 대사과정에 필수적으로 관여하여 황화를 유발하는 새로운 노화관련 유전자 (SAG: senescence-associated gene)라는 것을 확인할 수 있었다.

<79> 도 14는 유전자지도 작성에 사용된 자포니카형 녹색지속 변이체 (1 라인), 인디카형 밀양23호 (2 라인) 및 이들을 교배해서 얻은 F₁ hybrid 식물체 (3 라인)의 게놈 DNA를 *Dra*I으로 처리한 후, 정상형 *SGR* 유전자를 프로브로 하여 써던블로팅한 결과를 나타낸 것이다. 도 14에 나타난 바와 같이, *SGR* 유전자는 벼의 게놈상에서 단일 copy로 존재함을 알 수 있었다.

<80> *sgf* 변이유전자는 서열번호 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, *SGR* 유전자의 295 번째 염기인 G가 A로 치환되어 있었다. 또한 *sgf* 변이유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 정상 *SGR* 단백질의 274개 아미노산 서열 중 99번째 아미노산인 발린 (valine: gtg)이 메티오닌 (methionine: atg)으로 치환되어 있었다.

<81> **실시예 9: *SGR* 유사 유전자의 동정**

<82> 본 발명에 따른 서열번호 2의 폴리펩타이드와 상동성을 가지는 것을 NCBI Blast를 통하여 검색하고, 보존된 아미노산 서열 영역 (conserved amino acid sequence region)을 조사·비교하였다 (도 15). 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역 (conserved amino acid sequence region)과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드가 3종류 [애기장대의 At4g11910와 At4g22920 유전자 및 포플라 (poplar)의 S019E07 EST (GenBank Accession No: BU862745)] 존재하였다. 상기 3종류의 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드와 매우 높은 상동성을 가지고 있어 벼의 *SGR* 유전자와 같이 엽록소 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 것으로 추정된다.

<83> 이를 확인하기 위하여, 애기장대의 잎을 암처리시켜 노화를 유도한 다음, At4g22920과 At4g11910 유전자의 발현여부를 조사하였다. 애기장대의 At4g22920과 At4g11910 유전자의 염기서열로부터 primer를 제작한 다음, 이를 이용하여, 애기장대 성장 잎 (mature leaf)을 잘라 0(대조구), 1, 3, 6 및 9일간 암처리하여 얻은 RNA를

RT-PCR로 증폭하였다. 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 이들 두 유전자는 노화유도에 의해 강하게 발현되었으며, 이로부터 At4g2290과 At4g11910 유전자는, 벼의 유전자와 마찬가지로, 엽록소 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 유전자라는 것을 확인할 수 있었다.

<84> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<85> 본 발명은 식물의 노화시 엽록소 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 *SGR* 유전자 및 상기 유전자를 변이시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법을 제공하는 효과가 있다.

<86> 본 발명에 따르면, 황화가 일어나는 식물에서 상기 *SGR* 유전자를 변이시키거나,

SGR 유전자의 발현을 억제시키거나, 또는 상기 *SGR* 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 불활성화시킴으로써 식물의 황화를 방지하여 녹색을 오래 유지시킬 수 있다. 따라서 가축 여물용 풀을 보관기간 동안 녹색 및 높은 단백질 함량으로 유지할 수 있고, 특히, 골프장이나 공원의 잔디를 한여름 가뭄이나 한겨울에도 녹색을 오래 유지시킬 수 있어, 관광, 조경 및 레저산업에 매우 유용할 것으로 기대된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역 (conserved amino acid sequence region)과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하고, 식물 노화시 엽록소 분해대사에 관여하여 황화를 유발하는 *SGR* 유전자.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 *SGR* 유전자.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 *SGR* 유전자.

【청구항 4】

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드.

【청구항 5】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 *SGR* 유전자를 함유하는 재조합 벡터.

【청구항 6】

제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 미생물.

【청구항 7】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 *SGR* 유전자로 형질전환된 식물.

【청구항 8】

황화가 일어나는 식물에서 *SGR* 유전자를 변이시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 것임을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 11】

제8항에 있어서, 상기 변이는 상기 유전자의 일부를 결실시키거나, 상기 유전자의 일부를 단일 또는 복수의 다른 염기로 치환시키거나, 또는 상기 유전자에 단일 또는 복수의 다른 염기를 첨가시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 12】

제8항에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 서열번호 1의 *SGR* 유전자에서 295번째 염기인 G를 A로 치환시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 14】

항화가 일어나는 식물에서 *SGR* 유전자의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 15】

제14항에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 16】

제15항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 것임을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 17】

제14항에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 18】

황화가 일어나는 식물에서 *SGR* 유전자가 코딩하는 단백질을 무력화시키는 것을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 19】

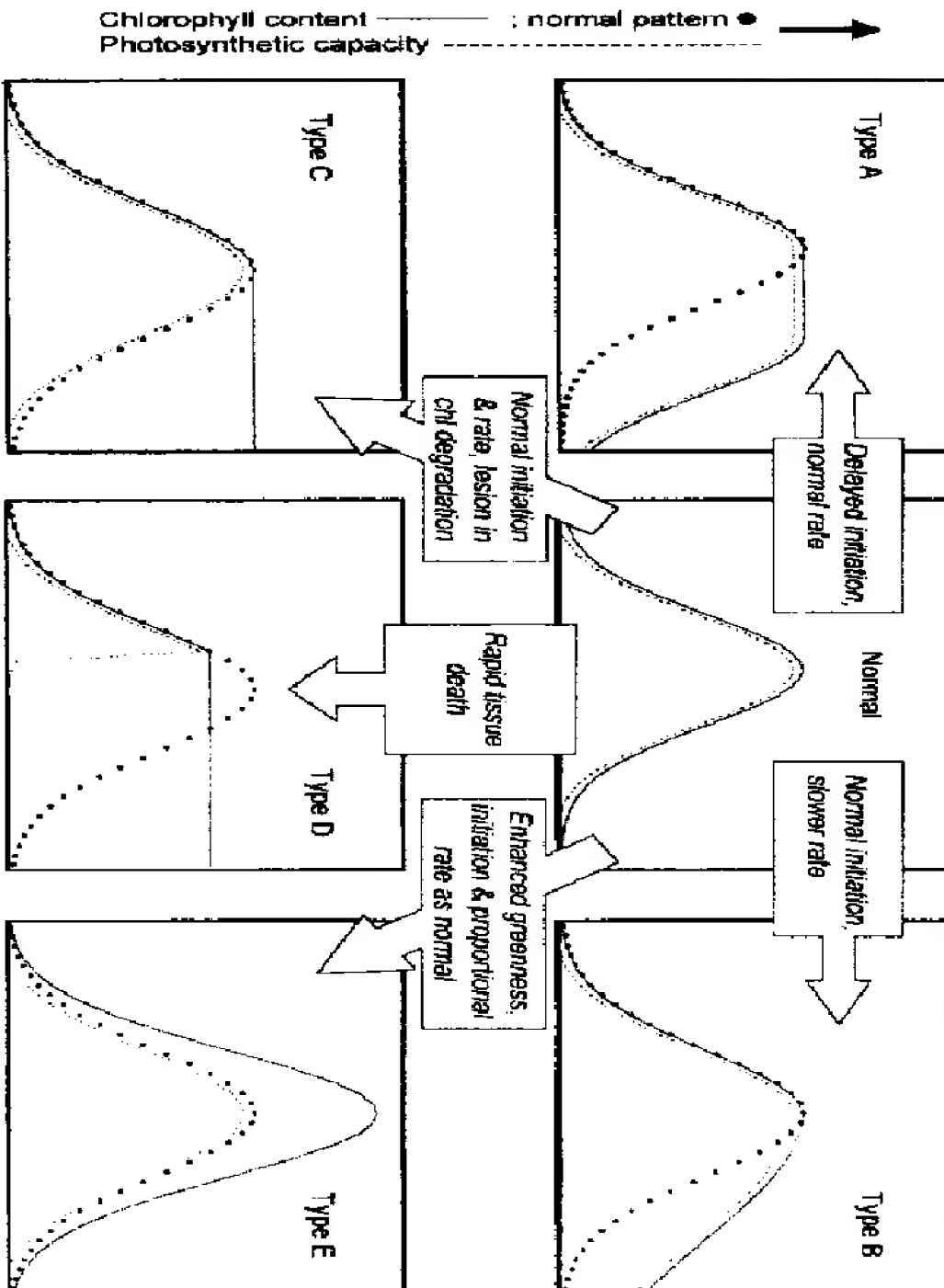
제18항에 있어서, 상기 *SGR* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 51~207의 보존된 아미노산 서열 영역과 75% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 것임을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【청구항 20】

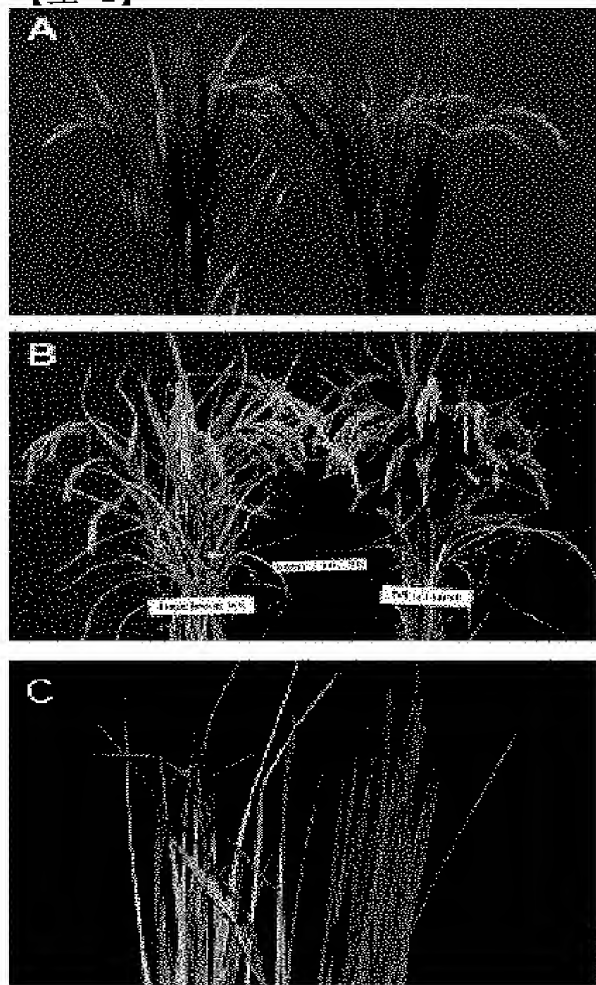
제19항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 것임을 특징으로 하는 녹색지속성 변이 식물체의 제조방법.

【도면】

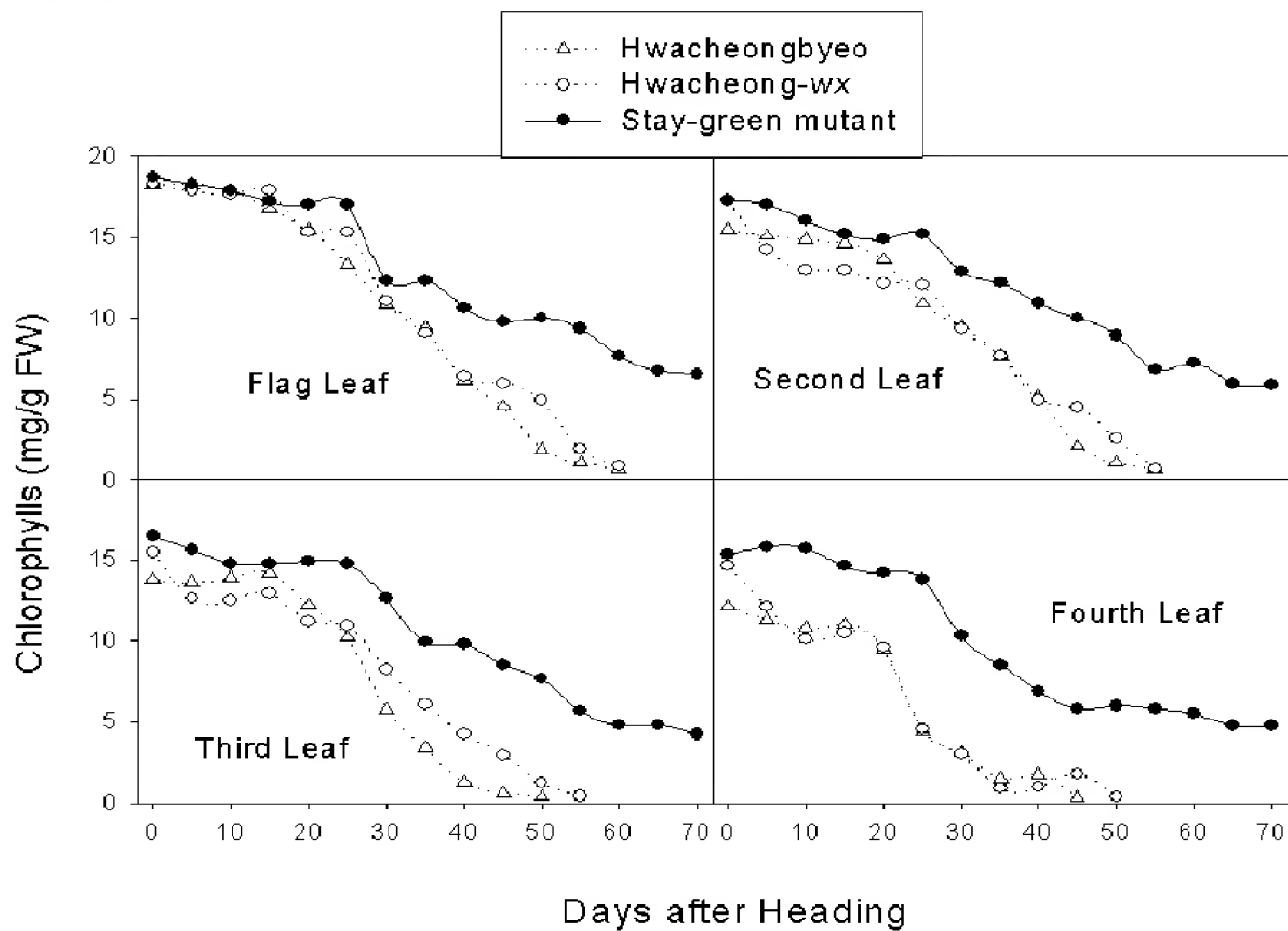
【도 1】



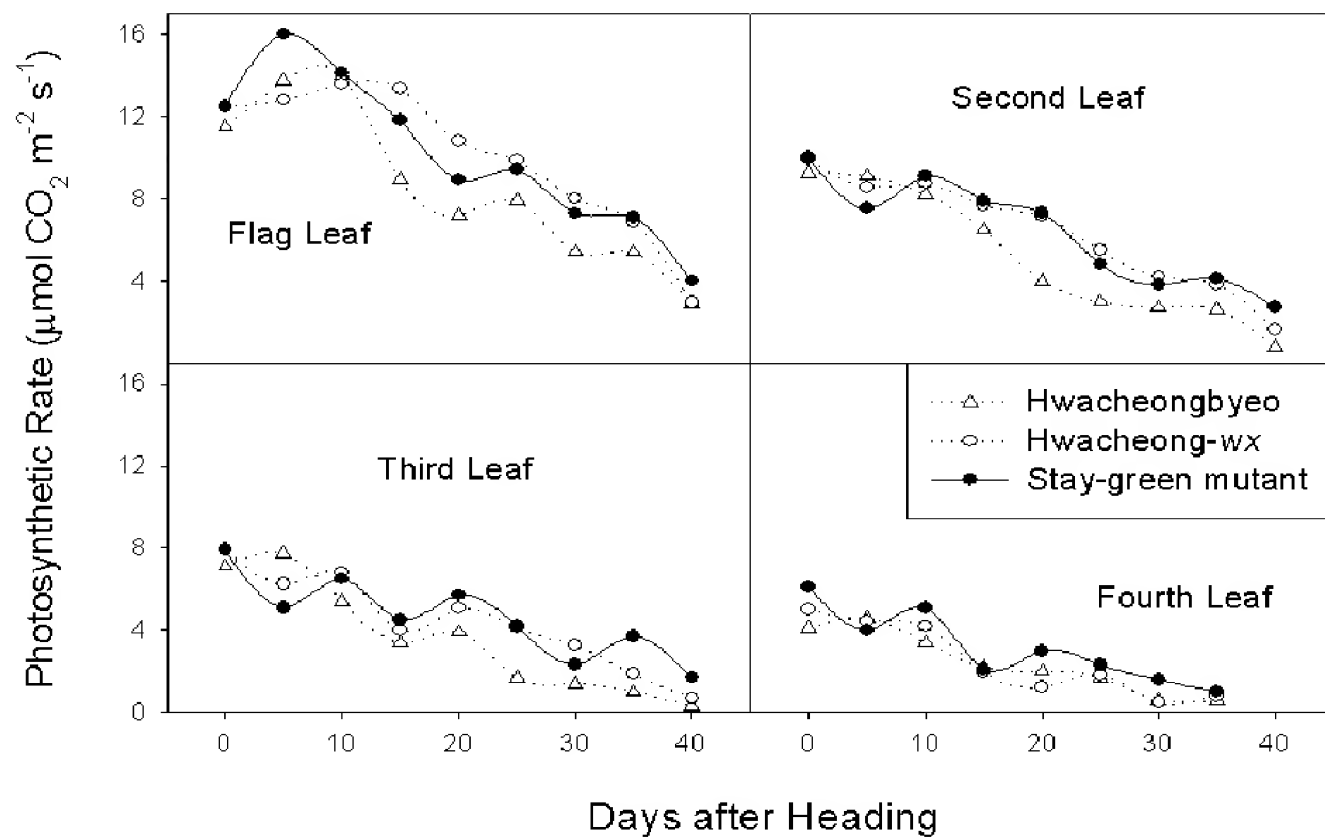
【도 2】



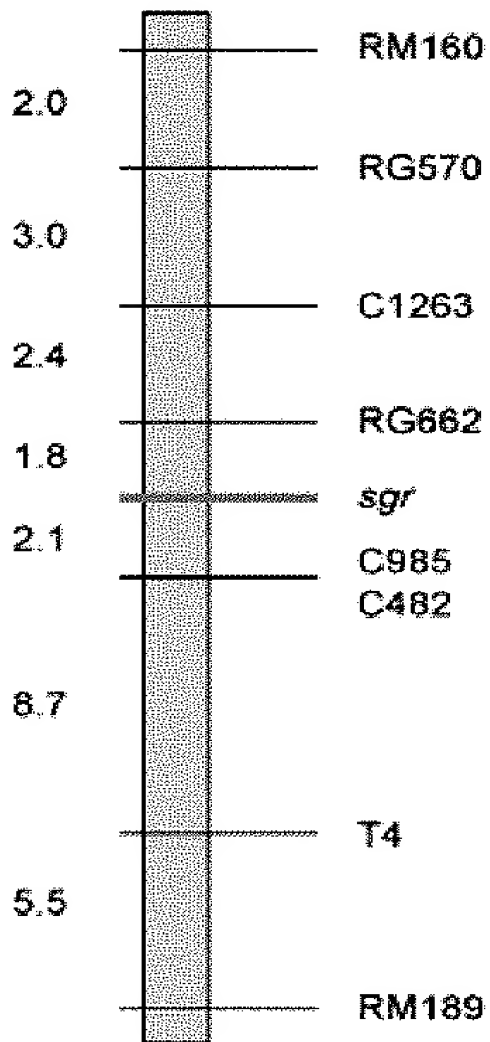
【도 3】

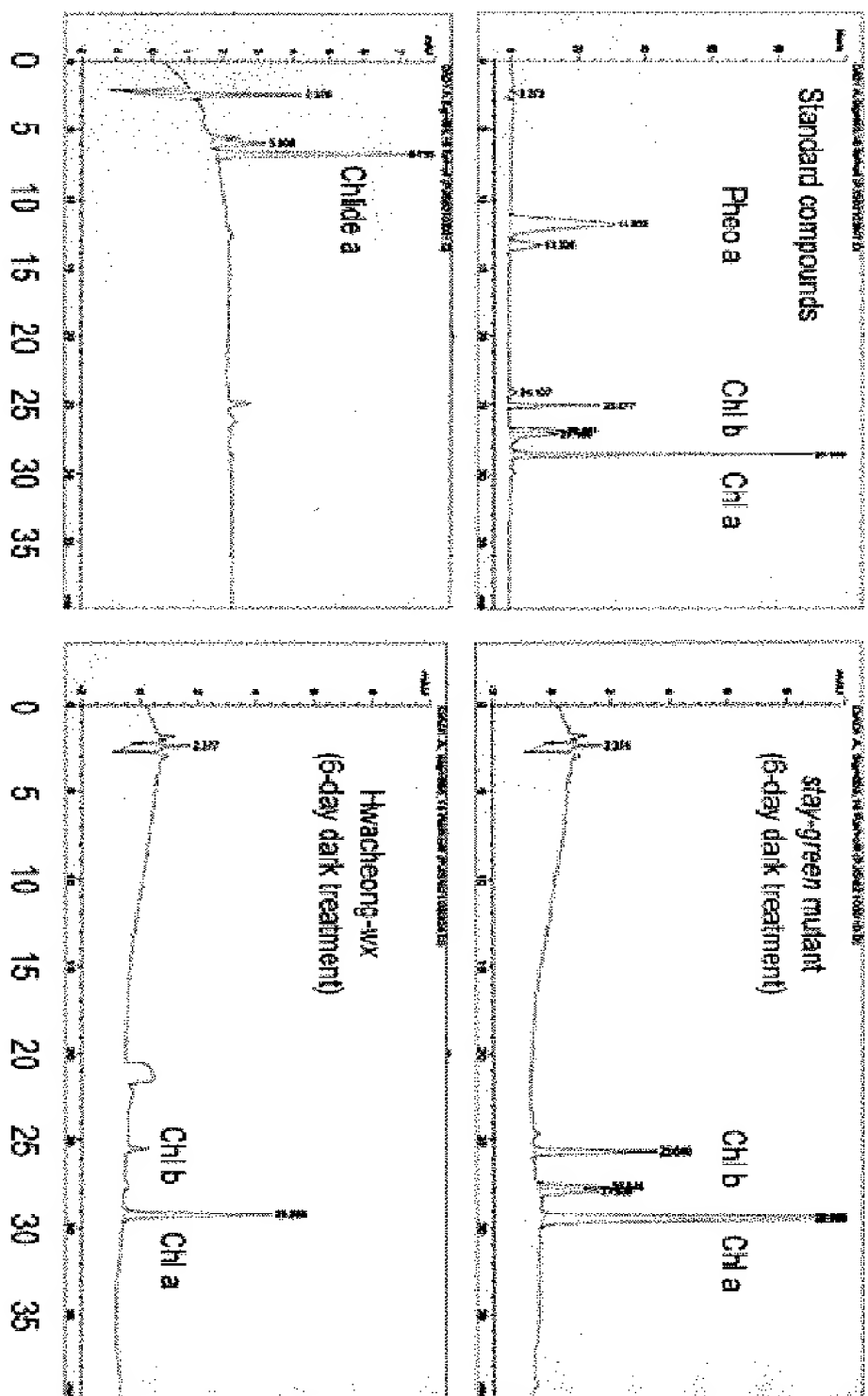


【图 4】



【도 5】

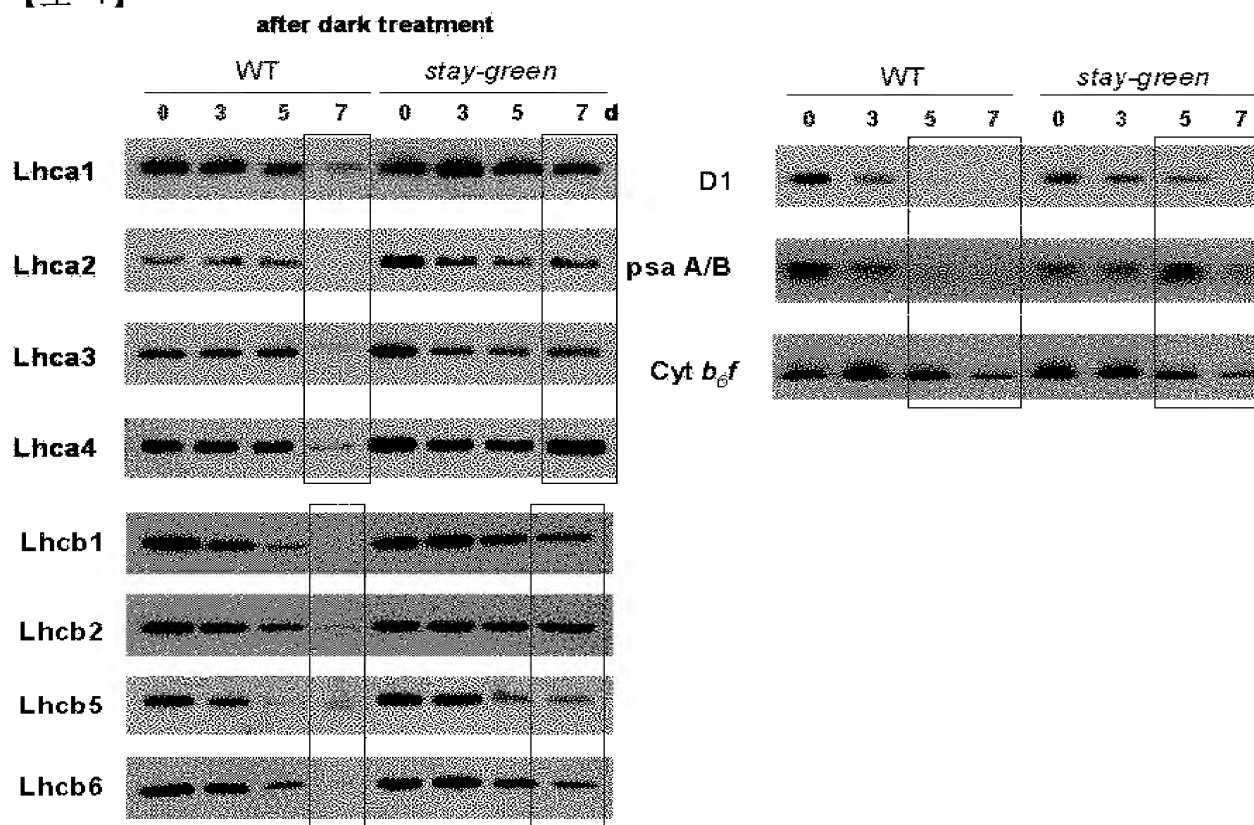




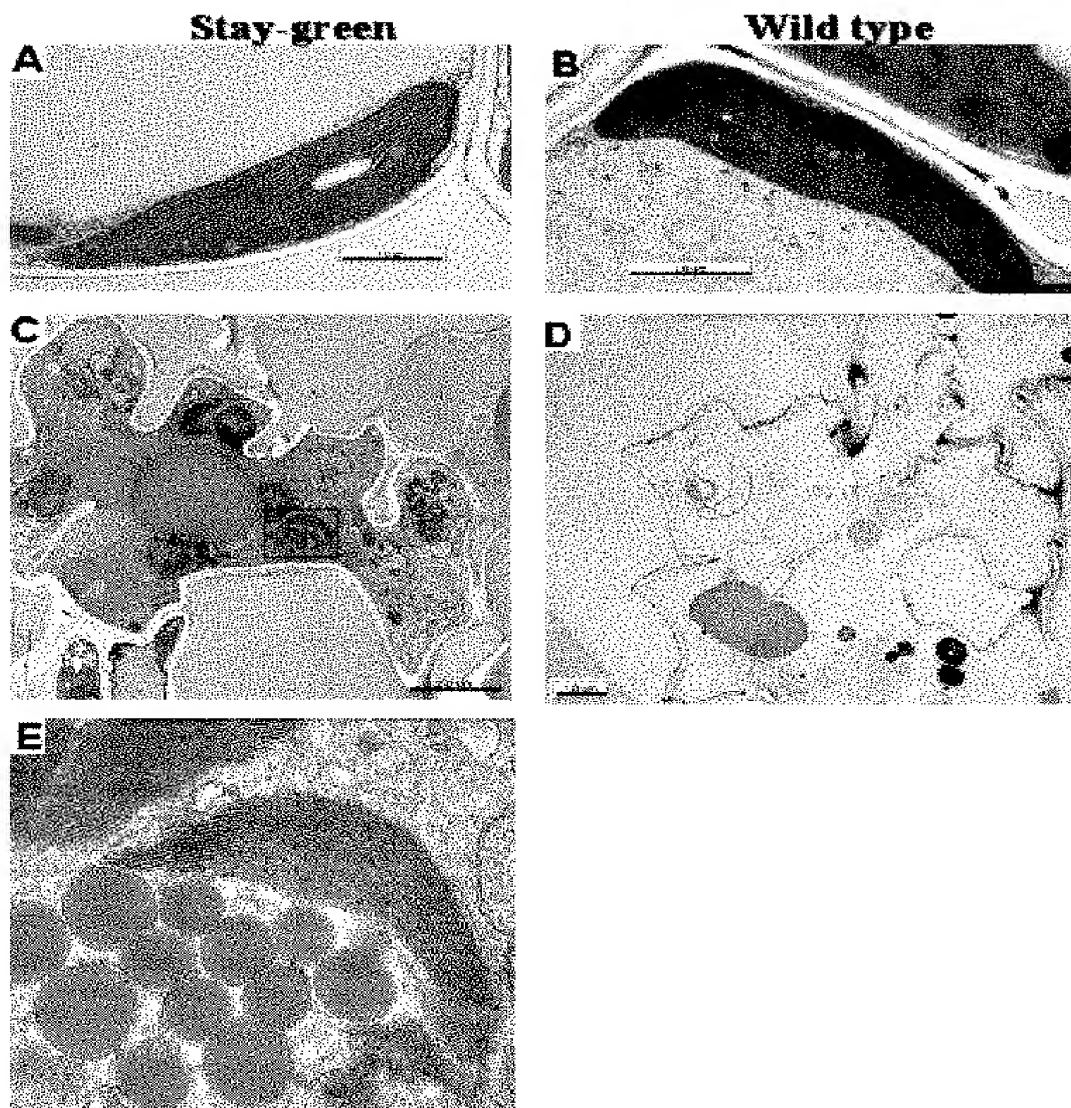
【도 6】

HPLC Running Time (min)

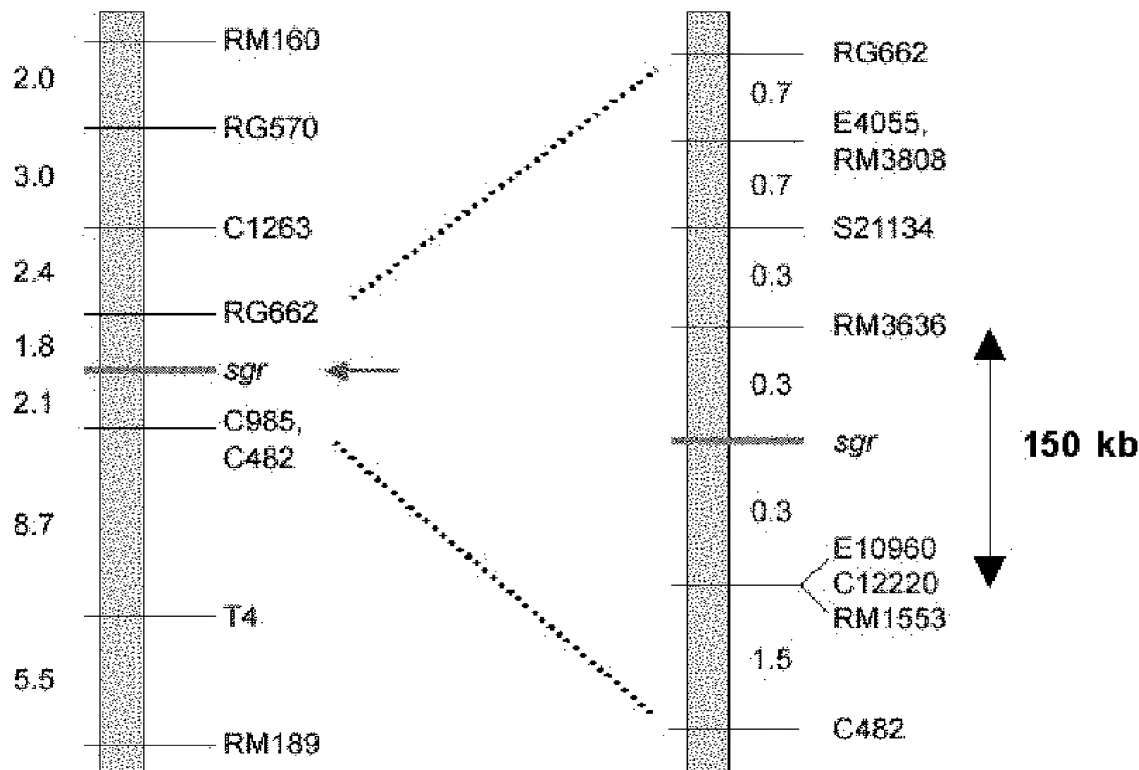
【도 7】



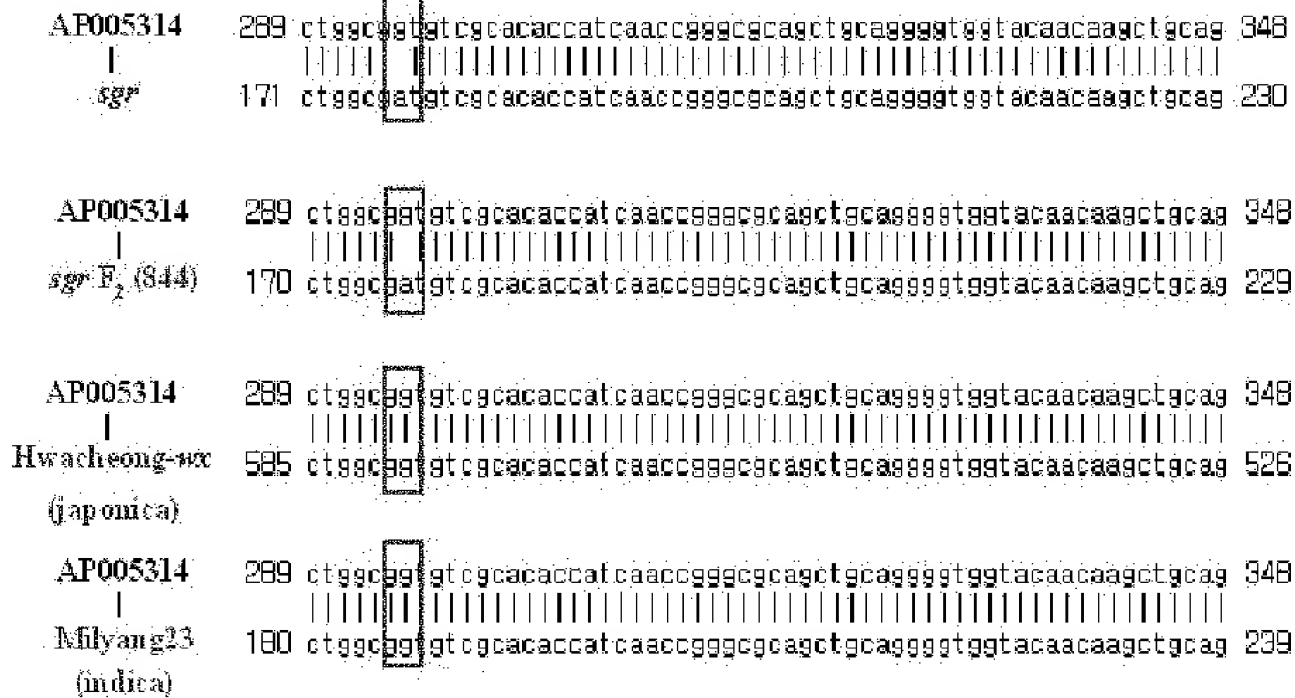
【도 8】



【도 9】



【도 10】



【도 11】

```

1  MAAATSTMELLPEITQQRWHAADELVVLASRCHNSRRERRRCRYVVPRAR 50
    chloroplast-targeting          PKC
    signal peptide

                                (gtg)
51  LFGPAIFEASKLKVLFLGVDEEKHQHPGKLPRTYTLTHSDVTARLTLAVS 100
                                CKII PKC    M
                                (atg)
                                (missense mutation)

101 HTINRAQLQGWNKLQRDEVVAEWKKVQGHMSLHVHCHISGGHVLLDLIA 150

151 GLRYIIFRKELPVVLKAFVHGDGNLFSRHPELEEATVWVYFHSNLPRFNR 200

201 VECWGPLRDAGAPPEEDDAVAAAAAEEAAAEQMPAAGEWPRRCFGQCDCC 250

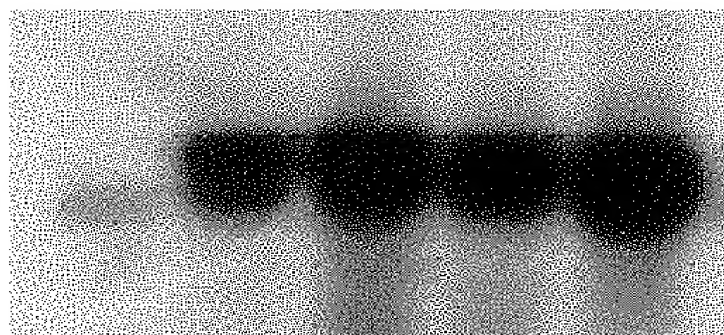
251 FPPYSLIPWPHQHDVAAADGQFQQ 274

```

【도 12】

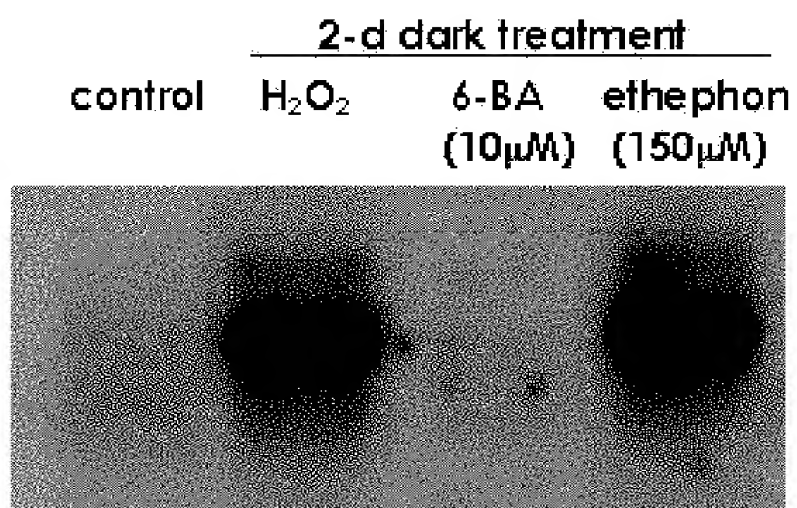
Darkness (days)

0 2 4 6 8

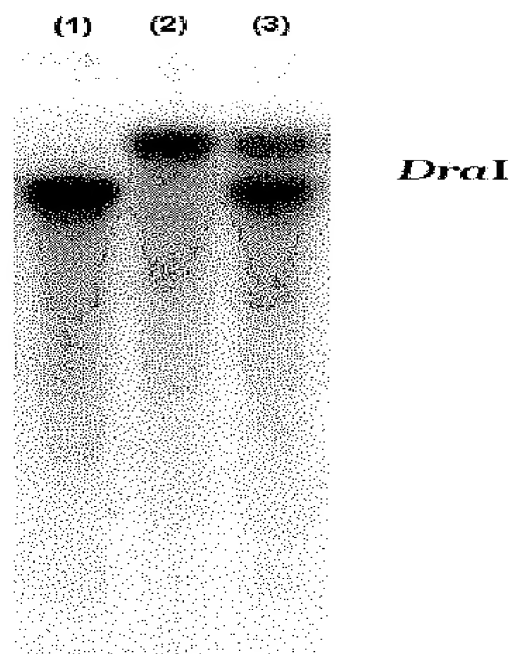


Northern

【図 13】



【図 14】



【도 15】

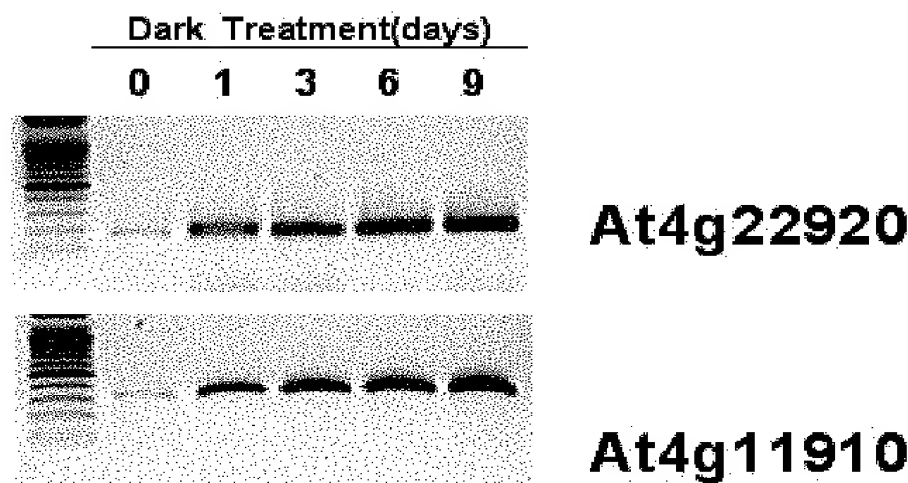
SGR : 51 LFGPAIFEASKLKVLFLGVDEEKHHPGKLPRITYTLTHSDVTARLT LAVSHTINRAQLQG 110
 At4g22920: 51 LFGPAIFEASKLKVLFLGVDEKKH--PSTLPRTYTLTHSDITAKLTLAISQSIHNSQLQG 108
 At4g11910: 47 LFGPAIFEASKLKVLFLGVDEKKH--PAKLPRITYTLTHSDITAKLTLAISQSIHNSQLQG 104
 Poplar : 45 LFGPSIFEASKLKVLFLGVDEKKH--PGMLPRITYTLTHSDITAKLTLAISQTIHNSQLQG 102
 Identical: *****+*****+* * *****+*****+*****+*****
 Similar : -----

SGR : 111 WSNKLYRDEVVNEWKKVVGKMSLIHVHCHISGGCHELLDLFAKFRYFIECKELPVVLKAFVH 170
 At4g22920: 109 WANLYRDEVVNEWKKVVGKMSLIHVHCHISGGCHELLDLFAKFRYFIECKELPVVLKAFVH 168
 At4g11910: 105 WANLYRDEVVNEWKKVVGKMSLIHVHCHISGGCHEFLMLIAKLRXYFIECKELPVVLEAFVH 164
 Poplar : 103 WSNKLYRDEVVNEWKKVVGKMSLIHVHCHISGGCHELLDLCCRLRYFIECKELPVVLKAFVH 162
 Identical: * *** *****+*****+ *****+*****+ *****+*****+
 Similar : -----

SGR : 171 GDGNLFSSRHPLEETVWVYFHSNIPENRVECWGPLRDAGAPPEEDDAVAAAAAEAAAA 230
 At4g22920: 169 GDGNLNNYPELOEALVWVYFHSNVHEENKVECWGPLWEAVSPDGHKTETLPEA----- 222
 At4g11910: 165 GDEYLNNHPELOESPVWVYFHSNIPENRVECWGPLWEAMSOHQHDGRTHKKSETLPEL 224
 Poplar : 163 GDGNLFSSYPELOEALVWVYFHSNIPENRVECWGPLKHAAAPYTAASGGAPENKEQATD 222
 Identical: ***** *****+*****+*****+*****+*****+
 Similar : -----

SGR : 231 EQMPAAGEWPRRCPGQCDCCEPPYSLEPWFHQHDAAADGQPPQ 274
 At4g22920: 223 -----RCADCECCCEPTVSSIPWSHSLSNEGYNQYSGTQTEGIATPNPEKL 268
 At4g11910: 225 -----PCPDECKCEPTVSTIPWSHPRHYQHTAADENVADGELLEIPNPGKSKG 271
 Identical: *****+*****+*****+
 Similar : -----

【도 16】



【서열목록】

<110> Seoul National University Industry Foundation <120> A Novel Stay Green Gene <130>
P04-028 <160> 7 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 825 <212> DNA <213> Oryza
sativa <400> 1 atggctgctg ctacttcgac catgtccctg cttcctccca tcaccagca gcagcgggtg 60
cacgccgccg actccctcgt cgtcctcgcc tcccgtgcc acaactctcg ccgccgccgc 120 cgctgccgct
acgtcgtgcc gagggcgagg ctgttcgggc cggcgatctt cgaggcgtcg 180 aagctgaagg tgctgttctt
gggggtggac gaggagaagc accagcaccg ggggaagctg 240 ccgcggacgt acacgctgac gcacagcgac
gtgacggcga ggctgacgct ggcggtgtcg 300 cacaccatca accgggcgca gctgcagggg tggtaaca
agctgcagcg ggacgaggtg 360 gtggcggagt ggaagaaggt gcagggccac atgtcgtgc acgtccactg
ccacatctcc 420 ggcgccacg tctcctcga cctcatcgcc ggctccgct actacatctt ccgcaaggag
480 ctccccgtgg ttctgaaggc gttcgtccac ggcgacggca acctgttcag ccggcaccgc 540 gagctggagg
agccacgggt gtgggtctac ttccactcca acctcccacg cttcaaccgc 600 gtcgagtgtc ggggcccgt
ccgcgacgcc ggagcgccgc ccgaggaaga cgacgccgtc 660 gccgcccgcc cggccgagga ggcgccggcg
gagcagatgc ccgcggccgg cgagtggccg 720 cggcgggtgcc cggggcagtg cgactgctgc ttcccgccat
acagcctcat cccctggccg 780 caccagcacg acgtcgccgc cgccgacggc cagccgcagc agtga
825 <210> 2 <211> 274 <212> PRT <213> Oryza sativa <400> 2 Met Ala Ala Ala Thr
Ser Thr Met Ser Leu Leu Pro Pro Ile Thr Gln 1 5 10
15 Gln Gln Arg Trp His Ala Ala Asp Ser Leu Val Val Leu Ala Ser Arg 20
25 30 Cys His Asn Ser Arg Arg Arg Arg Arg Cys Arg Tyr Val Val Pro Arg
35 40 45 Ala Arg Leu Phe Gly Pro Ala Ile Phe Glu Ala Ser Lys
Leu Lys Val 50 55 60 Leu Phe Leu Gly Val Asp Glu Glu Lys
His Gln His Pro Gly Lys Leu 65 70 75 80 Pro
Arg Thr Tyr Thr Leu Thr His Ser Asp Val Thr Ala Arg Leu Thr 85
90 95 Leu Ala Val Ser His Thr Ile Asn Arg Ala Gln Leu Gln Gly Trp Tyr
100 105 110 Asn Lys Leu Gln Arg Asp Glu Val Val Ala Glu Trp Lys

Lys Val Gln 115 120 125 Gly His Met Ser Leu His Val His
 Cys His Ile Ser Gly Gly His Val 130 135 140 Leu Leu Asp Leu
 Ile Ala Gly Leu Arg Tyr Tyr Ile Phe Arg Lys Glu 145 150 155
 160 Leu Pro Val Val Leu Lys Ala Phe Val His Gly Asp Gly Asn Leu Phe 165
 170 175 Ser Arg His Pro Glu Leu Glu Glu Ala Thr Val Trp Val Tyr Phe His
 180 185 190 Ser Asn Leu Pro Arg Phe Asn Arg Val Glu Cys Trp Gly
 Pro Leu Arg 195 200 205 Asp Ala Gly Ala Pro Pro Glu Glu
 Asp Asp Ala Val Ala Ala Ala Ala 210 215 220 Ala Glu Glu Ala
 Ala Ala Glu Gln Met Pro Ala Ala Gly Glu Trp Pro 225 230 235
 240 Arg Arg Cys Pro Gly Gln Cys Asp Cys Cys Phe Pro Pro Tyr Ser Leu 245
 250 255 Ile Pro Trp Pro His Gln His Asp Val Ala Ala Ala Asp Gly Gln Pro
 260 265 270 Gln Gln <210> 3 <211> 825 <212> DNA <213>
 Oryza sativa <400> 3 atggctgctg ctacttcgac catgtccctg cttcctccca tcaccagca gcagcgggtgg
 60 cagcgccgcg actccctcgt cgtcctcgcc tcccgctgcc acaactctcg ccgcccgcgc 120 cgctgccgct
 acgtcgtgcc gagggcgagg ctgttcgggc cggcgatcct cgaggcgtcg 180 aagctgaagg tgctgttctt
 ggggggtggac gaggagaagc accagcaccg ggggaagctg 240 ccgcggacgt acacgctgac gcacagcgac
 gtgacggcga ggctgacgct ggcgatgtcg 300 cacaccatca accgggcgca gctgcagggg tggtaaca
 agctgcagcg ggacgaggtg 360 gtggcggagt ggaagaaggt gcagggccac atgtcgtcgc acgtccactg
 ccacatctcc 420 ggcgggccacg tcctcctcga cctcatcgcc ggccctccgt actacatctt ccgcaaggag
 480 ctccccgtgg ttctgaaggc gttcgtccac ggcgacggca acctgttcag ccggcaccgc 540 gagctggagg
 aggccacggt gtgggtctac ttccactcca acctcccacg ctccaaccgc 600 gtcgagtgtc ggggcccgc
 ccgcgacgcc ggagcgccgc ccgaggaaga cgacgccgtc 660 gccgcccggg cggccgagga ggcggcggcg
 gagcagatgc ccgcggccgg cgagtggccg 720 cggcgggtgcc cggggcagtg cgactgctgc ttcccgccat
 acagcctcat cccctggccg 780 caccagcagc acgtcgccgc cgccgacggc cagccgcagc agtga
 825 <210> 4 <211> 274 <212> PRT <213> Oryza sativa <400> 4 Met Ala Ala Ala Thr

Ser Thr Met Ser Leu Leu Pro Pro Ile Thr Gln 1 5 10
15 Gln Gln Arg Trp His Ala Ala Asp Ser Leu Val Val Leu Ala Ser Arg 20
25 30 Cys His Asn Ser Arg Arg Arg Arg Arg Cys Arg Tyr Val Val Pro Arg
35 40 45 Ala Arg Leu Phe Gly Pro Ala Ile Phe Glu Ala Ser Lys
Leu Lys Val 50 55 60 Leu Phe Leu Gly Val Asp Glu Glu Lys
His Gln His Pro Gly Lys Leu 65 70 75 80 Pro
Arg Thr Tyr Thr Leu Thr His Ser Asp Val Thr Ala Arg Leu Thr 85
90 95 Leu Ala Met Ser His Thr Ile Asn Arg Ala Gln Leu Gln Gly Trp Tyr
100 105 110 Asn Lys Leu Gln Arg Asp Glu Val Val Ala Glu Trp Lys
Lys Val Gln 115 120 125 Gly His Met Ser Leu His Val His
Cys His Ile Ser Gly Gly His Val 130 135 140 Leu Leu Asp Leu
Ile Ala Gly Leu Arg Tyr Tyr Ile Phe Arg Lys Glu 145 150 155
160 Leu Pro Val Val Leu Lys Ala Phe Val His Gly Asp Gly Asn Leu Phe 165
170 175 Ser Arg His Pro Glu Leu Glu Glu Ala Thr Val Trp Val Tyr Phe His
180 185 190 Ser Asn Leu Pro Arg Phe Asn Arg Val Glu Cys Trp Gly
Pro Leu Arg 195 200 205 Asp Ala Gly Ala Pro Pro Glu Glu
Asp Asp Ala Val Ala Ala Ala Ala 210 215 220 Ala Glu Glu Ala
Ala Ala Glu Gln Met Pro Ala Ala Gly Glu Trp Pro 225 230 235
240 Arg Arg Cys Pro Gly Gln Cys Asp Cys Cys Phe Pro Pro Tyr Ser Leu 245
250 255 Ile Pro Trp Pro His Gln His Asp Val Ala Ala Ala Asp Gly Gln Pro
260 265 270 Gln Gln <210> 5 <211> 268 <212> PRT <213>
Arabidopsis sp. <400> 5 Met Cys Ser Leu Ser Ala Ile Met Leu Leu Pro Thr Lys Leu Lys Pro 1
5 10 15 Ala Tyr Ser Asp Lys Arg Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser
Ser Leu Phe 20 25 30 Phe Asn Asn Arg Arg Ser Lys
Lys Lys Asn Gln Ser Ile Val Pro Val 35 40 45 Ala Arg

Leu Phe Gly Pro Ala Ile Phe Glu Ser Ser Lys Leu Lys Val 50 55
 60 Leu Phe Leu Gly Val Asp Glu Lys Lys His Pro Ser Thr Leu Pro Arg 65 70
 75 80 Thr Tyr Thr Leu Thr His Ser Asp Ile Thr Ala Lys Leu Thr Leu Ala
 85 90 95 Ile Ser Gln Ser Ile Asn Asn Ser Gln Leu Gln Gly Trp
 Ala Asn Arg 100 105 110 Leu Tyr Arg Asp Glu Val Val
 Ala Glu Trp Lys Lys Val Lys Gly Lys 115 120 125 Met Ser
 Leu His Val His Cys His Ile Ser Gly Gly His Phe Leu Leu 130 135
 140 Asp Leu Phe Ala Lys Phe Arg Tyr Phe Ile Phe Cys Lys Glu Leu Pro 145 150
 155 160 Val Val Leu Lys Ala Phe Val His Gly Asp Gly Asn Leu Leu Asn Asn
 165 170 175 Tyr Pro Glu Leu Gln Glu Ala Leu Val Trp Val Tyr Phe
 His Ser Asn 180 185 190 Val Asn Glu Phe Asn Lys Val
 Glu Cys Trp Gly Pro Leu Trp Glu Ala 195 200 205 Val Ser
 Pro Asp Gly His Lys Thr Glu Thr Leu Pro Glu Ala Arg Cys 210 215
 220 Ala Asp Glu Cys Ser Cys Cys Phe Pro Thr Val Ser Ser Ile Pro Trp 225 230
 235 240 Ser His Ser Leu Ser Asn Glu Gly Val Asn Gly Tyr Ser Gly Thr Gln
 245 250 255 Thr Glu Gly Ile Ala Thr Pro Asn Pro Glu Lys Leu
 260 265 <210> 6 <211> 271 <212> PRT <213> Arabidopsis
 sp. <400> 6 Met Cys Ser Leu Ala Thr Asn Leu Leu Leu Pro Ser Lys Met Lys Pro 1
 5 10 15 Val Phe Pro Glu Lys Leu Ser Thr Ser Ser Leu Cys Val
 Thr Thr Arg 20 25 30 Arg Ser Lys Met Lys Asn Arg
 Ser Ile Val Pro Val Ala Arg Leu Phe 35 40 45 Gly Pro
 Ala Ile Phe Glu Ala Ser Lys Leu Lys Val Leu Phe Leu Gly 50 55
 60 Val Asp Glu Lys Lys His Pro Ala Lys Leu Pro Arg Thr Tyr Thr Leu 65 70
 75 80 Thr His Ser Asp Ile Thr Ala Lys Leu Thr Leu Ala Ile Ser Gln Ser
 85 90 95 Ile Asn Asn Ser Gln Leu Gln Gly Trp Ala Asn Lys Leu

Phe Arg Asp 100 105 110 Glu Val Val Gly Glu Trp Lys
Lys Val Lys Gly Lys Met Ser Leu His 115 120 125 Val His
Cys His Ile Ser Gly Gly His Phe Phe Leu Asn Leu Ile Ala 130 135
140 Lys Leu Arg Tyr Tyr Ile Phe Cys Lys Glu Leu Pro Val Val Leu Glu 145 150
155 160 Ala Phe Ala His Gly Asp Glu Tyr Leu Leu Asn Asn His Pro Glu Leu
165 170 175 Gln Glu Ser Pro Val Trp Val Tyr Phe His Ser Asn Ile
Pro Glu Tyr 180 185 190 Asn Lys Val Glu Cys Trp Gly
Pro Leu Trp Glu Ala Met Ser Gln His 195 200 205 Gln His
Asp Gly Arg Thr His Lys Lys Ser Glu Thr Leu Pro Glu Leu 210 215
220 Pro Cys Pro Asp Glu Cys Lys Cys Cys Phe Pro Thr Val Ser Thr Ile 225 230
235 240 Pro Trp Ser His Arg His Tyr Gln His Thr Ala Ala Asp Glu Asn Val
245 250 255 Ala Asp Gly Leu Leu Glu Ile Pro Asn Pro Gly Lys Ser
Lys Gly 260 265 270 <210> 7 <211> 223 <212>
PRT <213> poplar trees <400> 7 Met Gly Ser Leu Ala Ile Ala Pro Phe Leu Pro Ser Lys Leu
Arg Pro 1 5 10 15 Ser Ile Leu Asp Gln Asn Ser
Ser Leu Phe Pro Ser Lys Lys Lys Leu 20 25 30 Lys
Arg Lys Asn Gln Ser Ile Ser Pro Val Ala Arg Leu Phe Gly Pro 35 40
45 Ser Ile Phe Glu Ala Ser Lys Leu Lys Val Leu Phe Leu Gly Val Asp 50 55
60 Glu Lys Lys His Pro Gly Asn Leu Pro Arg Thr Tyr Thr Leu Thr His 65 70
75 80 Ser Asp Ile Thr Ala Lys Leu Thr Leu Ala Ile Ser Gln Thr Ile Asn
85 90 95 Asn Ser Gln Leu Gln Gly Trp Ser Asn Lys Leu Tyr Arg
Asp Glu Val 100 105 110 Val Ala Glu Trp Lys Lys Val
Lys Gly Lys Met Ser Leu His Val His 115 120 125 Cys His
Ile Ser Gly Gly His Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys Arg Leu 130 135
140 Arg Tyr Phe Ile Phe Arg Lys Glu Leu Pro Val Val Leu Lys Ala Phe 145 150

155		160	Phe His Gly Asp Gly Asn Leu Phe Ser Ser Tyr Pro Glu Leu Gln Glu		
165		170		175	Ala Leu Val Trp Val Tyr Phe His Ser Asn Ile Pro Glu
Phe Asn Lys		180		185	
				190	Val Glu Cys Trp Gly Pro Leu
Lys His Ala Ala Ala Pro Tyr Thr Ala			195	200	
					205
Gly Gly Ala Pro Glu Asn Lys Glu Gln Ala Thr Asp Trp				210	
					215
220					